

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-506129
(P2001-506129A)

(43) 公表日 平成13年5月15日 (2001.5.15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A
A 6 1 K 31/715		A 6 1 K 31/715	
	31/716	31/716	
A 6 1 P 1/00		A 6 1 P 1/00	
C 0 8 B 37/00		C 0 8 B 37/00	P
		審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願平10-527120
(86) (22) 出願日 平成9年12月18日 (1997. 12. 18)
(85) 翻訳文提出日 平成11年6月21日 (1999. 6. 21)
(86) 国際出願番号 PCT/AU97/00859
(87) 国際公開番号 WO98/26787
(87) 国際公開日 平成10年6月25日 (1998. 6. 25)
(31) 優先権主張番号 PO4304
(32) 優先日 平成8年12月19日 (1996. 12. 19)
(33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 ザ、ユニバーシティ、オブ、ニュー、サウス、ウェイルズ
オーストラリア連邦ニューサウスウェイルズ州、ケンジントン、アンザック、パレイド (番地なし)
(71) 出願人 コモンウェルス、サイエンティフィック、エンド、インダストリアル、リサーチ、オーガナイゼーション
オーストラリア連邦オーストラリアン キャピタル テリトリー キャンベル、ライムストーン アベニュー (番地なし)
(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プレバイオテックスおよびプロバイオテックス

(57) 【要約】

ベーターグルカン、それから誘導された化合物またはそれらの混合物を、単独で、あるいは他のプレバイオテックおよび/または1または2以上のプロバイオテック微生物と組み合わせて、動物に供給して、摂取されたとき、ベーターグルカンは実質的に利用されないで胃腸管を通過して、微生物の定住集団および/または、供給された場合、導入されたプロバイオテック微生物によりベーターグルカンが利用される胃腸管内の部位にベーターグルカンが到達し、これにより、乳酸産生微生物の定住集団および、供給された場合、プロバイオテック微生物、の数および/または活性を増加させる、ことからなる、動物の胃腸管内の乳酸産生微生物、好ましくはラクトバシラス (*Lactobacillus*)、の定住集団を増強する方法。

【特許請求の範囲】

1. ベーターグルカン、それから誘導された化合物またはそれらの混合物を、単独あるいは他のプレバイオテックおよび／または1または2以上のプロバイオテック微生物と組み合わせて、動物に供給して、摂取されたとき、ベーターグルカンは実質的に利用されないで胃腸管を通過して、微生物の定住集団および／または、供給された場合、導入されたプロバイオテック微生物によりベーターグルカンが利用される胃腸管内の部位にベーターグルカンが到達し、これにより、乳酸産生微生物の定住集団および、供給された場合、プロバイオテック微生物、の数および／または活性を増加させる、ことからなることを特徴とする、動物の胃腸管内の乳酸産生微生物の定住集団を増強する方法。

2. ベーターグルカン、それから誘導された化合物またはそれらの混合物を、単独あるいは他のプレバイオテックおよび／または1または2以上のプロバイオテック微生物と組み合わせて、動物に供給して、摂取されたとき、ベーターグルカンは実質的に利用されないで胃腸管を通過して、微生物の定住集団および／または、供給された場合、導入されたプロバイオテック微生物によりベーターグルカンが利用される胃腸管内の部位にベーターグルカンが到達し、これにより、乳酸産生微生物の定住集団および、供給された場合、プロバイオテック微生物、の数および／または活性を増加させ、そして望ましくない微生物集団を抑制する、ことからなることを特徴とする、動物の胃腸管内の全体の微生物集団中の望ましくない微生物集団の増殖および／または活性を抑制する方法。

3. 望ましくない微生物集団が腸の病原体である、請求項2に記載の方法。

4. ベーターグルカンが植物、真菌類、酵母、または細菌に由来する調製物である、請求項1、2または3に記載の方法。

5. ベーターグルカンがベーターグルカンに富んだ酵母細胞壁の調製物また

は全酵母細胞に由来する、請求項4に記載の方法。

6. 酵母がサッカロマイセス (*Saccharomyces*) である、請求項5に記載の方法。

7. サッカロマイセス (*Saccharomyces*) がサッカロミセス・

セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である、請求項6に記載の方法。

8. 他のプレバイオテックスおよび／またはプロバイオテック微生物と組み合わせるとき、ベーターグルカン 10% (w/w) までの濃度で使用する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

9. ベーターグルカン 1% (w/w) の濃度で使用する、請求項8に記載の方法。

10. 定住乳酸産生微生物がラクトバシラス (*Lactobacillus*) である、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

11. ラクトバシラス (*Lactobacillus*) がラクトバシラス・フェルメンツム (*Lactobacillus fermentum*) である、請求項10に記載の方法。

12. プロバイオテック微生物が、乳酸産生微生物、ビフィドバクテリウム (*bifidobacterium*)、酵母、またはそれらの混合物から成る群より選択される、請求項12に記載の方法。

13. 乳酸産生微生物がラクトバシラス (*Lactobacillus*) である、請求項12に記載の方法。

14. ラクトバシラス (*Lactobacillus*) がラクトバシラス・フェルメンツム (*Lactobacillus fermentum*) である、請求項13に記載の方法。

15. 酵母がサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 種である、

請求項12に記載の方法。

16. プロバイオテック微生物を $10^3 \sim 10^{13}$ 細胞／日の濃度で投与する、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**プレバイオテックスおよびプロバイオテックス****技術分野**

本発明は、一般に、プレバイオテックス (prebiotics) およびプロバイオテックス (probiotics) の調製物を使用して、宿主のヒトおよび動物の胃腸管における微生物集団に関係する腸の健康および症状を改善し、これにより宿主の健康および幸福を改善することに関する。

背景技術

プロバイオテックスの概念は1900年代の始めにおいて使用されたが、この用語は1965年に単に作り変えられ、引き続いて展開され、そして多数の定義が提案されてきている。初期に、それは抗生物質の他の物質、すなわち、反対の物質による1つの微生物の増殖の刺激を言及するために使用された。今日、プロバイオテックは「ヒトまたは動物に適用され、常在の微生物相の性質を改良することによって宿主に有益に影響を与える、生きている微生物の」調製物であることが一般に合意されている。乳酸細菌、特にラクトバシラス (lactobacillus) はプロバイオテックとして頻繁に使用されている。また、ビフィドバクテリアはプロバイオテックとして広範に使用されている。さらに、胃腸由来の微生物およびこのような微生物に関係する株もプロバイオテックとして使用することができる。

胃腸 (常在) 微生物相は、宿主の健康および幸福に有意に寄与する。それは個体において 10^{14} 細菌までに到達することができる複雑な、多様な集団であり、宿主に対して有益な作用および有害な作用を及ぼす。胃腸の微生物相の有益な作用および有害な作用のあるものは表1に要約されている。これらのパラメーター

はプロバイオテックの投与により影響を受けることがあることが観察される。

健康な被検体の腸の微生物相は、宿主を病原体の侵襲から保護するが、若い、中年過ぎの、および弱体化した患者において、この保護バリアは有効さに劣る。個体は、小さいストレスに関係する事象から極端な症例、例えば、免疫無防備状態の患者および治療を受けている患者までに、種々の程度に弱体化されることが

ある。

プレバイオテックという用語は、望ましい微生物のための炭水化物源を提供するために優先的に使用されることができる炭水化物調製物を意味するために造り出された。

表 1

宿主に対するヒト腸の微生物相の影響

有益な作用	有害な作用
病原体の阻害	便秘
免疫系の刺激	下痢
ビタミンの合成	感染
消化の促進	肝損傷
腸細胞の代謝燃料の生産	癌
生態系の安定性の維持	鼓腸
薬剤の代謝	過敏性腸
	潰瘍性大腸炎
	クローン病

グルカンは細胞壁の多糖類であり、主要糖がグルコースであり、主として1, 3結合およびまた1, 6結合をもつベータ結合を有する。グルカンは本来黒色真菌類から単離されたが、その後、酵母細胞壁の中に大量に見出された。グル

カンは腸内の常在ビフィズス菌を増殖させることが示され、そして腸をコンディショニングするための製剤として有用であることが提案された。グルカンは、腹腔内に添加されたとき、免疫刺激因子（例えば、Brattgjerd et al.、1994）として機能することが報告された。

プロバイオテック細菌は抗菌作用を発揮することが記載され、これは他の微生物または微生物のグループに対するプロバイオテック調製物の作用を言及する。いくつかのプロバイオテック細菌は腸の病原体に対する抵抗の増強、下痢および

便秘の予防のために直接適用可能である (Fernandes et al.、1987; Katelaris、1996; Sanders、1994に概観されている)。相互作用の型は、競合コロニー化ならびに付着および増殖阻害を包含する。

競合コロニー化は、プロバイオテック株が栄養分またはコロニー化部位について病原体と首尾よく競合することができる事実を意味する。多数の胃腸の病原体は、感染の第1ステップとして、腸粘膜に取付くので、この付着を阻害することができるならば、宿主にとって有益であろう。ラクトバシラス (*Lactobacillus*) は腸粘膜への腸毒素原性大腸菌 (*Escherichia coli*) の付着を阻害する成分を産生するという報告 (Blomberg et al.、1993) が存在するが、これが消化管内で起こるという証拠はまだ存在しない。さらに、プロバイオテックの増殖の間に産生された種々の化合物は病原体の増殖を阻害することが示された (Fernandes et al.、1987; Klaenhammer、1988; MishraおよびLambert、1996に概観されている)。これらは有機酸、例えば、乳酸および酢酸、レウテリン (*reuterin*) およびバクテリオシン (*bacteriocins*) を包含する (Tagg et al.、1976)。有機酸はpHを低下させ、これにより病原体の増殖に直接的に影響を与えることができる。さらに、

これらの微生物が生産した乳酸および酢酸は微生物に対して毒性であることがある。非常に広い範囲の細胞の増殖を阻害するレウテリン (LindgrenおよびDobrogosz、1990) は、グリセロールの存在において増殖するとき、ラクトバシラス・レウテリ (*Lactobacillus reuteri*) により生産される。多数のバクテリオシンはラクトバシラス (*Lactobacillus*)、例えば、アシドフィリン (*Acidophilin*)、アシドリン (*Acidolinn*)、ラクトシジン (*Lactocidin*)、バクテリオシン (*Bacterocin*)、ブルガリカン (*Bulgarican*)、ラクトリン (*Lactolin*)、ラクトバシリン (*Lactobacilli*) およびラクトブレビン (*Lactobrevin*) により生産されることが

報告された (Fernandes et al.、1987; Klaenhamer、1988に概観されている)。バクテリオシンは非常に広い範囲の活性を有するか、あるいは非常に制限された範囲の密接に係る微生物の増殖を特異的に阻害することができる。例えば、ラクトバシラス (*Lactobacillus*) 種は、クロストリジウム・ラモスム (*Clostridium ramosum*) に対する特定の拮抗作用を示した (McCrnickおよびsavage、1983)。

本発明者らは、驚くべきことには、病原体の付着に影響を及ぼし、胃腸管内の微生物集団を変更し、プロバイオテック組成物の有効性を改良するために、ベーターグルカンを使用できることを発見した。ベーターグルカンのある範囲の粗製および純粋な調製物は有効であることが示された。

発明の開示

第1の面において、本発明は、動物の胃腸管内の乳酸産生微生物の定住集団を増強する方法に関し、この方法は、ベーターグルカン、それから誘導された化合物またはそれらの混合物を、単独で、あるいは他のプレバイオテックスおよび／

または1または2以上のプロバイオテック微生物と組み合わせて、動物に供給して、摂取されたとき、ベーターグルカンは実質的に利用されないで胃腸管を通過して、微生物の定住集団および／または、供給された場合、導入されたプロバイオテック微生物によりベーターグルカンが利用される胃腸管内の部位にベーターグルカンは到達し、これにより、乳酸産生微生物の定住集団および、供給された場合、プロバイオテック微生物、の数および／または活性を増加させることからなる。

第2の面において、本発明は、動物の胃腸管内の全体の微生物集団中の望ましくない微生物集団を抑制する方法に関し、この方法は、ベーターグルカン、それから誘導された化合物またはそれらの混合物を、単独で、あるいは他のプレバイオテックおよび／または1または2以上のプロバイオテック微生物と組み合わせて、動物に供給して、摂取されたとき、ベーターグルカンは実質的に利用されないで胃腸管を通過して、微生物の定住集団および／または、供給された場合、導

入されたプロバイオテック微生物によりベーターグルカンが利用される胃腸管内の部位にベーターグルカンは到達し、これにより、乳酸産生微生物の定住集団および、供給された場合、プロバイオテック微生物、の数および／または活性を増加させ、そして望ましくない微生物集団の増殖および／または活性を抑制することからなる。

好ましい形態において、望ましくない微生物集団は腸の病原体である。理解されるように、グラム陰性菌、例えば、サルモネラ (*Salmonella*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、カンピロバクテル (*Campylobacter*)、ヘリコバクター (*Helicobacter*)、ビブリオ (*Vibrio*) およびシュドモナス (*Pseudomonas*)；グラム陽性菌、例えば、クロストリジウム (*Clostridium*)；ウイルス、例えば、ノーウォーク様ウイルス、ノーウォーク様ウイルス類およびロタウイルス；

および原生動物、例えば、クリトスポリジウム (*Cryptosporidium*)、エンタメバ (*Entamoeba*)、ギアルジア (*Giardia*)、およびジエンタメバ (*Dientamoeba*) を包含する多数の病原体が存在する。本発明は、動物の胃腸管内のこれらの病原体の多数の抑制に適當であろう。

適当なベーターグルカンは、(a) 植物、例えば、穀物、例えば、カラスムギおよびオオムギ、(b) 真菌類、(c) 酵母、および (d) 細菌に由来するベーターグルカンを包含する。さらに、ベーターグルカンに富んだ微生物細胞壁の調製物または全細胞は、また、本発明に有用なベーターグルカン調製物に適當な源である。グルカン中のモノマー残基は1-3および1-4、または1-3および1-6結合を有することができ(すなわち、モノマー単位は1, 3, 1, 4または1, 6結合を通して接合されている)そして各型の百分率は変化することができる。好ましくは、酵母、特にサッカロマイセス (*Saccharomyces*)、好ましくはサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来するベーターグルカンを本発明に使用する。しかしながら、他のベーターグルカンも適當であることが理解されるであろう。他のプロバイオテックスおよび／またはプロバイオテックス微生物と組み合わせるとき、

約10%までの濃度を使用することができる。1%は特に適当であることが見出された。定住乳酸産生微生物は、好ましくはラクトバシラス (*Lactobacillus*)、より好ましくはラクトバシラス・フェルメンツム (*Lactobacillus fermentum*) である。

好ましい形態において、本発明は、1または2以上のオリゴ糖、多糖または他のプレバイオテックをさらに含む。約0.001g~10g/kg体重/日のオリゴ糖、多糖または他のプレバイオテックの濃度は好ましい。

好ましくはプロバイオテック微生物は、乳酸産生微生物、ビフィドバクテリウム (*bifidobacterium*)、酵母、またはそれらの混合物から成る

群より選択される。好ましくは、乳酸産生微生物はラクトバシラス (*Lactobacillus*)、より好ましくはラクトバシラス・フェルメンツム (*Lactobacillus fermentum*) である。好ましくは、酵母はサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 種である。

プロバイオテック微生物の典型的な濃度は $10^3 \sim 10^{13}$ 細胞/日である。

本発明の以前において、オリゴ糖は動物におけるビフィズス菌の数を増加することが示されたが、ラクトバシラス (*Lactobacillus*) の数は同様な方法で変化できないと考えられた。Gibson et al. 1995は、オロゴフルクトースおよびイヌリンは、ヒトに供給したとき、ラクトバシラス (*Lactobacillus*) の数に影響を及ぼさないで、ビフィズス菌の増殖を選択的に刺激することを発見した。これらの結果およびこの分野における他の者の観察から、本発明者らが *in vivo* で発見したように、ベーターグルカンが乳酸産生微生物、特にラクトバシラス (*Lactobacillus*) の増殖および/または活性を積極的に影響を及ぼすであろうことは期待されなかったであろう。

この明細書を通じて、特記しない限り、用語「からなる」または変形、例えば、「からなり」は、記載する要素または整数あるいは要素または整数のグループを包含することを意味するが、任意の他の要素または整数あるいは要素または整数のグループを排除することを意味しないことを理解すべきである。

本発明をいっそう理解できるように、下記の実施例および図面を参照して、好ましい形態を説明する。

図面の簡単な説明

第1図は、ベーターグルカンの食事または対照の食事を供給した動物の胃腸管内のラクトバシラス (*Lactobacillus*) の結果を示す。

第2図は、ベーターグルカンの食事または対照の食事を供給した動物の糞便ベ

ーターグルカン分解微生物を示す。酵母細胞嚢を含有する寒天プレート上のベーターグルカン分解活性の分析。

発明の実施の形態

実施例1

これは *in vitro* でベーターグルカンの存在において大腸菌型、ビフィズス菌およびラクトバシラスを数えることによって研究した。この実施例において使用したベーターグルカンは酵母細胞嚢から調製した。さらに詳しくは、ヒト糞便ホモジネート (10 g / 100 ml の希釈剤) のアリコート (1 ml) を希釈した WC ブロス (0.05 M のリン酸塩緩衝液で 50 : 50 に希釈した) に添加し、これにベーターグルカンおよびラクトバシラスまたはビフィドバクテリウムの株を添加した。組合わせの各々について、平行の管を調製し、1つの組はビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 種またはラクトバシラス (*Lactobacillus*) 種を接種した。次いで、すべての混合物を 24 時間までインキュベートし、そして細菌数を数えた。コロニー形成単位として数えたとき、大腸菌型、合計のラクトバシラス、合計のビフィドバクテリウム、または合計の嫌気性菌の数として、結果を表す (表 1)。理解されるように、大腸菌型の数は未変化であるか、あるいは減少するが、ビフィズス菌またはラクトバシラスの数を 10 倍まで増加し、そして属内の選択したグループを増強することができる。

表 2

ラクトバシラスおよびビフィドバクテリウムに対する 1% の

ベーターグルカンの効果

培地混合物	細菌数 (CFU/ml)			
	大腸菌型	ラクトバシラス		ビフィドバクテリウム
		合計	大きいコロニー	
糞便ホモジネート	3.2×10^8	3.4×10^5	1.2×10^5	< 2
FH+1%グルカン	5.2×10^8	5.3×10^5	4.8×10^5	< 2
FH+ビフィドバクテリウム (SUB)	NA	NA	NA	1.0×10^6
FH+SUB+1%グルカン	NA	NA	NA	1.2×10^7
FH+ <i>L. fermentum</i> (Lf)	NA	2.8×10^5	2.8×10^5	NA
FH+Lf+1%グルカン	NA	1.2×10^6	1.2×10^6	NA

NA—分析せず

実施例2

この実施例は、ベーターグルカンを使用する食事補充物質がラクトバシラス (*Lactobacillus*) の胃腸内集団を刺激することを証明する。この研究において、動物 (8匹/グループ) に、ベーターグルカンの食事に頼る対照食事を与えた (表3)。この実施例において使用したベーターグルカンは酵母細胞囊から調製した。6週の給餌後、動物を安楽死させ、そして管腔内容物を胃、回腸、盲腸および結腸から収集した。収集した材料を均質化し、ウィルケンスーチャルグレン (Wilkens-Charlgren) ブロス (Oxoid) 中

で希釈した。希釈物をロゴサ・ギアー (*Rogosa gear*) (Oxoid) 上に広げ、48時間嫌氣的にインキュベートした。ベーターグルカンに富んだ食事は、ラクトバシラス (*Lactobacillus*) の有意に $P < 0.0005$ に増加させ、特に胃の領域において100倍の増加が検出された (第1図)。引き続き腸管内のラクトバシラスの数の増加は約 $1.5 \log$ 単位に相当し

た。

表 3

ベーターグルカンおよびスクロースの食事の組成

成分	量 (グルカン食事)	量 (対照食事)
ベーターグルカン	450	0
スクロース	150	600
カゼイン	200	200
ヒマワリ	25	25
カーラ油	25	25
ゼラチン	20	20
コムギぬか	100	100
塩化コリン	2	2
メチオニン	3	3
標準ミネラルミックス	35	35
標準ビタミンミックス	10	10

実施例 3

微生物の増殖に対する効果の研究に加えて、付着に対する効果を研究した。望ましい細菌、例えば、ラクトバシラス、ならびに望ましくない病原体、大腸菌（*E. coli*）およびサルモネラ（*Salmonella*）種を、標準的実験室用ブロス中で、あるいはベーターグルカンを補充したこのブロス中で増殖させた。この実施例において使用したベーターグルカンは酵母細胞囊から調製した。細菌懸濁液を胃腸管の種々の領域からの粘膜片とインキュベートした。これらの粘膜片を直接使用するか、あるいはベーターグルカンで前処理した後使用した。結果を表4に示す。病原体の付着は悪影響を受けたが、ラクトバシラスの付着はベーターグルカンの存在により増加した。

表 4

付着に対するベーターグルカンの効果

細菌	細菌の付着 (1 m g 組織)		
	対照組織	組織+1%グルカン	減少 (%)
<i>S. typhimurium</i>	1.69×10^8	5.53×10^7	-65
<i>E. coli</i> K38	6.07×10^7	3.43×10^7	-50
<i>L. fermentum</i>	5.37×10^8	6.2×10^8	0

実施例 4

この実施例は下記の事実を証明する。すなわち、ベーターグルカンを補充した食事はクロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) およびサルモネラ・ティフィリウム (*S. typhimurium*) による胃腸の感染に対する耐性を増加し、そしてグルカン処置したマウスにサルモネラ (*Salmonella*) 種の細胞懸濁液をまた投与したとき、この効果

は増強される。この実施例において使用したベーターグルカンは、酵母の酸およびアルカリ洗浄した細胞囊から調製した。サルモネラ (*Salmonella*) 種単独はクロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) の数をある程度減少させ、そしてサルモネラ・ティフィリウム (*S. typhimurium*) を顕著に減少させた。動物のグループ (4グループ、8匹の動物/グループ) に、ベーターグルカンの食事またはクロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) を与えた (表3)。4週間の給餌後、4グループにセフォキシチン (0.032 g/l) およびD-シクロセリン (1.0 g/l) を含有する飲料水を供給し、引き続いてクロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) (10^{-8} CFU) でチャレンジした。他の4グループに、ストレプトマイシン (5 g/l) およびネオマイシン (5 g/l) を含有する飲料水を供給した。これらの動物を引き続いてサルモネラ・ティフィリウム (*S. typhimurium*) (10^{-7} CFU) でチャレンジした。病原体のチャレンジ後、動物に口胃的にサルモネラ (*Salmonella*) 種 (FII542900サルモネラ・ティフィリウム (*S. typhimurium*)) (YPGブロス

中の 10^8 CFU)、または新鮮なYPGブrosを投与した。糞便のサルモネラ・ティフィリウム (*S. typhimurium*) またはクロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) の分析により、感染の発生を毎日モニターした。糞便材料を均質化し、ウィルキンズーチャルグレン (Wilkins-Chargren) ブros (Oxoid) 中で希釈した。希釈物を、それぞれ、糞便のサルモネラ・ティフィリウム (*S. typhimurium*) および/またはクロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) の分析のために、YSA (Oxoid) またはクロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) 選択的寒天 (Oxoid) 上に広げた。

ベーターグルカンに富んだ食事を供給した分析は、クロストリジウム・ディフ

ィシレ (*C. difficile*) によるコロニー化に対して有意にいっそう保護された (表5)。クロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) の糞便レベルは、ベーターグルカンを供給した動物において、チャレンジ後第1日に、クロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) を供給した動物において検出されたレベルよりも約2 log 単位だけ低かった ($P < 0.05$)。サルモネラ・ティフィリウム (*S. typhimurium*) の非有意の減少がベーターグルカン処置マウスにおいて認められたが、サルモネラ (*Salmonella*) 種単独を投与したとき1 log 3の減少が認められた ($P < 0.05$)。ベーターグルカンの食事とサルモネラ (*Salmonella*) 種の経口投与との組合わせは、クロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) およびサルモネラ (*Salmonella*) 種を投与した双方のマウスと比較したとき、有意な減少を生じた ($P < 0.05$) (表5)。この減少は、それぞれ、クロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) およびサルモネラ・ティフィリウム (*S. typhimurium*) について、3および > 4 単位に相当した。これは、ベーターグルカンとサルモネラ (*Salmonella*) 種との組合わせで処置した動物における、体重の喪失および重度の感染の他の徴候の顕著な改善に対応した。有益な相乗的効果はベーターグルカン単独により達成しかつベーターグルカンとサルモネラ (*Salmonella*) 種

との組合わせにより増強することができると、結論することができる。

表 5

C. difficile または S. typhimurium でチャレンジしたベーターグルカン供給マウスに対するサルモネラ *Salmonella* 種の経口投与による病原体の減少

食事	減少 (log CFU/g 糞便)	
	C. difficile	S. typhimurium
ベーターグルカン	1.5 *	≤
ベーターグルカンおよび Saccharomyces sp	3 **	> 4 **
Saccharomyces sp	0.8	3 *

* ベーターグルカンを含有しない食事と有意に異なる ($P < 0.05$)。

** ベーターグルカンを含有しない食事およびサルモネラ (*Salmonella*) 種単独と有意に異なる。

実施例 5

この実施例は下記の事実を証明する：

- (i) ベーターグルカン分解微生物は胃腸管内に存在する；
- (ii) ベーターグルカンの食事への補充は、ベーターグルカン分解微生物（乳酸産生微生物を包含する）の胃腸内の集団を刺激する。

この研究において、分析（8匹／グループ）にベーターグルカンの食事または対照食事（表3）を与えた。4週の給餌後、糞便材料を収集し、均質化し、ウィルキンスーチャルグレン (Wilkins-Chargren) ブロス (Oxoid) 中で希釈した。希釈した材料をベーターグルカン寒天（表6）上に広げ、嫌氣的に57時間インキュベートした。ベーターグルカン分解微生物により形成されたコロニーの回りに、透明なゾーンが発生した。

対照食事を与えた動物に関して、ベーターグルカン分解集団の密度はベーター

グルカンの食事を与えた動物において100倍までより大きかった(第2図)。

表6

ベーターグルカン寒天の組成

成分	量 (g/L)
酵母エキス	2.5
トリトン	5.0
ペプトン	7.5
ベーターグルカン	10
システイン	0.5
NaCl	2.0
K ₂ HPO ₄	2.0
KH ₂ PO ₄	1.0
NaHCO ₃	2.0
MgCl	0.2
CaCl ₂	0.2
CoCl ₂	0.02
MnCl ₂	0.02
FeSO ₄	0.005
Tween 80	2
ヘミン	0.005
ビタミンB12	0.001
ビタミンK	0.0005
寒天	13.0

実施例6

この実施例は、ある範囲のベーターグルカンが観察された効果を誘発することを証明する。多数のサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から調製されたベーターグルカン、および細菌由来のベーターグルカンを使用した。粗製の形態およびより精製された形態の双方を試験した。粗製の形態は、水で2~3回洗浄し、噴霧乾燥した全細胞囊であった。

より精製された形態は水で洗浄した調製物から調製し、引き続いてこれをアルカリ洗浄し、次いで酸洗浄し、次いで水で洗浄した後、噴霧乾燥した。これらの種々のベーターグルカンの形態を実験室用媒質中で希釈した糞便ホモジネートとインキュベートし、グルカン寒天（表6）上のラクトバシラスの純粋な培養物を使用して試験したとき、すべての形態はラクトバシラスにより分解され（表7）、選択的に利用された。

表7

混合糞便スラリーによるベーターグルカン調製物の発酵

	ベーターグルカン試料				
	1	2	3	4	5
分解 (%)	50	>60	>60	>70	>50
細胞嚢/場					
0時間	156	NA	NA	塊状化	NA
72時間	9.2	NA	NA	75	NA
乾燥残留物 (g)	0.3048	0.2630	0.3097	0.3950	NA
合計の嫌気性菌	2.9×10^5	3.1×10^7	1.4×10^7	1.9×10^7	NA

ベーターグルカン1 — 水で洗浄したサルモネラ (*Salmonella*) A株の細胞嚢。

ベーターグルカン2 — アルカリーおよび酸ー洗浄したサルモネラ (*Salmonella*) B株の細胞嚢（調製物1）。

ベーターグルカン3 — アルカリーおよび酸ー洗浄したサルモネラ (*Salmonella*) B株の細胞嚢（調製物2）。

ベーターグルカン4 — 水で洗浄したサルモネラ (*Salmonella*) B株の細胞嚢。

ベーターグルカン5 — 細菌由来の細胞嚢。

NAー分析せず。

実施例 7

この実施例は下記の事実を証明する。すなわち、マウス消化管の上部領域において酵母囊のベーターグルカンの分解は低く、そして動物の盲腸および結腸（ここでは微生物の集団が最大である）において分解は起こる。3匹のSPF B a l b / c マウスの2グループに40%w/wの酵母細胞囊のベーターグルカンを含有する食事を60時間与えた。マウスを殺した後、胃、十二指腸、回腸、空腸、盲腸および大便を採取した。胃腸内容物を腸の区画から絞り出し、そして大便試料を個々に50mMのリン酸塩緩衝液で均質化し、そしてホモジネートの1滴を顕微鏡のスライド上に置いた。マウスの腸管の試料からのベーターグルカンの分解を位相差顕微鏡により検査した。ベーターグルカンの顆粒は胃および腸内で20%より少なく分解されたが、盲腸および糞便ホモジネートにおいて70%より大きい分解が認められた（表8）。

表 8

マウス腸管内のベーターグルカンの分解

分解	試料源					
	胃	十二指腸	回腸	空腸	盲腸	大便
分解	<10%	NO	<20%	<20%	>70%	>80%

NO—観察されず；わずかの酵母細胞囊がその領域において観察された。多分、移行が急速であったためである。

産業上の利用可能性

本発明は、微生物がヒトおよび動物の双方における疾患の原因となる因子として同定または提案され、そして胃腸管の有益な微生物相の数および／または活性を変更することによって、有利に影響を受ける、すべての症状に適用することができる。

感染性下痢はプロバイオテックの投与により改善されることが示されたので、

本発明はプロバイオテックそれ自体の作用を増強するために、そして単独で経口投与されるとき、微生物誘発下痢を減少するために、使用することができる。さらに、本発明は、プロバイオテック単独により影響を受けないことが示された非感染性下痢に効果的に使用することができる。本発明は、食事に関係する下痢の問題の影響を減少するとき有効である。

感染性下痢は、原因となる因子が微生物（細菌、ウイルスおよび原生動物を包含する）であることが示された、急性および慢性の双方の、下痢のすべての症例

を意味する。感染性下痢は、多数の方法で発現することができる：例えば、（a）乳児下痢および老人下痢、（b）抗生物質関連下痢、（c）旅行者下痢、（d）ストレス誘導下痢。

予防および治療の双方の使用を本明細書において記載した。予防的使用は、個体が、例えば、潜在的問題に暴露されることがあるときの予防に関係づけることができる：（i）腸が浄化され、次いで望ましくない微生物集団により再コロニー化されることがあるときにおける、研究的胃腸検査、（ii）個体をより低い感染量の病原体により病気にかかりやすくさせることがある、変更した病原体の負荷または食事の変化を包含する種々の因子のための腸の生態系の変更に暴露された旅行者。治療的使用は、腸の微生物相の望ましくない均衡に関係する確立された症状の治療、または確立された病原体の感染の治療に関する。

要約すると、グルカン調製物は、単独で、あるいはプロバイオテックおよび／またはプレバイオテック、例えば、オリゴ糖と一緒に、下記の状況において使用される治療的または予防的使用のための食物または他の調製物の中に含めることができる：

- i. 一般的腸微生物相の安定剤として。
- ii. 胃腸の微生物相に直接または間接的に関係する臨床的症状、例えば、過敏性腸症候群（IBS）および炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、下痢および便秘、結腸癌、睡眠疾患、慢性関節リウマチ、慢性疲労症候群、活動過剰、および潰瘍性大腸炎において。
- iii. 腸の健康の改善。

i v. 有益な活性が増強し、例えば、抗菌剤またはブチレートのレベルが増加し、かつ有害な活性が減少する、例えば、トキシンの産生が減少するように、微生物の代謝に直接的に影響を及ぼす。

v. 直接または間接的に胃腸の微生物の複雑な混合物において望ましい微生物

物の数に直接的に影響を及ぼす。

vi. 直接または間接的に胃腸の微生物の複雑な混合物において望ましくない微生物の数に直接的に影響を及ぼす。

本発明者らは、ペーターグルカンおよびオリゴ糖は、腸内の有益な微生物により選択的に使用され、これにより引き続いて望ましくない微生物の数を抑制することができる炭水化物であることを発見した。

当業者が理解するように、本発明の精神および範囲から逸脱しないで特定の態様に示した本発明に対して種々の変化および変更が可能である。したがって、本発明の態様は、すべての面において、例示でありかつ非限定的であると考慮すべきである。

参考文献

Brattgjerd, S.、Evensen, O. Lauve, A. (1994)。in vitroの過酸化水素の産生および食作用能力により評価した、アトランチック・サーモン、サルモ・サラーLにおけるマクロファージの活性に対する、注入した酵母グルカンの作用。Immunology 83:288-94。

Blomberg, L.、Henriksson, A. およびConway, P. L. (1993)。ラクトバシラス (*Lactobacillus*) 種による子豚の回腸粘膜に対する大腸菌 (*Escherichia coli*) K88の阻害。Applied and Environmental Microbiology 59:34-39。

Fernades, C. F.、Shahani, K. M. およびAmer, M. A. (1987)。食事性ラクトバシラス発酵乳産物の治療的役割。FEMS Microbiology Reviews 46、343-356。

Gibson, G. R.、Beatty, E. R.、Wang, X. およびCummings, J. H. (1995)。オリゴフルクトースおよびイヌリンによるヒト結腸中のビフィズス菌の選択的刺激。Gastroenterology 108、975-982。

Katellaris, P. H. (1996)。下痢疾患のプロバイオテックスコントロール。Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 5、39-43。

Klaenhammer, T. R. (1988)。乳酸細菌のバクテリオシン。Biochemie 70、337-349。

Lindgren, S. E. およびDobrogosz, W. J. (1990)。食物および飼料の発酵における乳酸細菌の拮抗活性。FEMS Microb

iology Reviews 87、149-164。

McCormick、E. L. およびSavage、D. C. (1983)。
ネズミ胃腸管からのラクトバシラス (*Lactobacillus*) 種1000
-37株の特性決定:生態学、プラスミド含量、およびクロストリヅム・ラモス
ム (*Clostridium ramosum*) H1に対する拮抗活性。Appl.
Environ. Microbiol. 46、1103-。

Mishra、C. およびLambert、J. (1996)。プロバイオテ
ックスによる抗菌物質の産生。Asia Pacific Journal o
f Clinical Nutrition 5、20-24。

Sanders、M. E. (1994)。ヒトの健康のプロモーターとしての
乳酸細菌。In Functional foods、pp. 294-322、
I. Goldbert編。New York:Chapman and Hal
l。

Tagg、J. R. 、Dajani、A. S. およびWannamaker、
L. W. (1976)。グラム陽性菌のバクテリオシン。Bacteriol.
Rev. 40、722-756。

【図1】

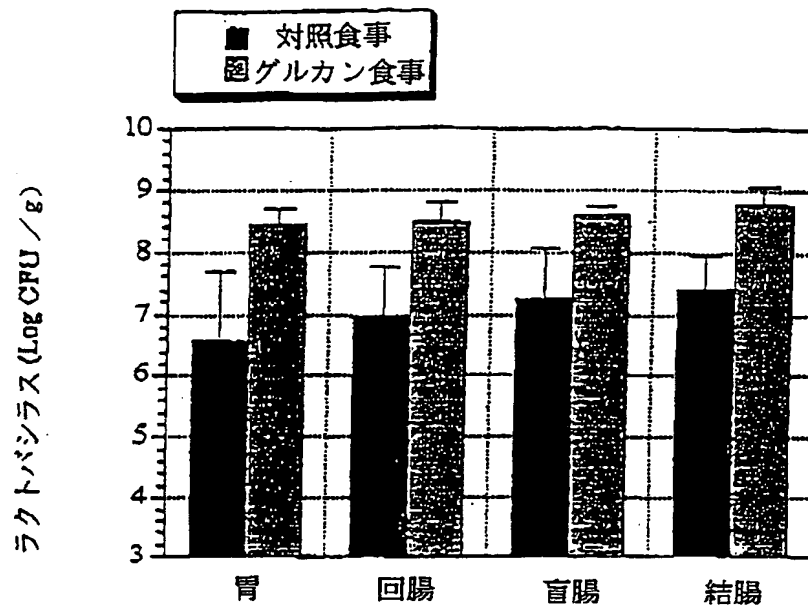


Fig. 1

【図2】

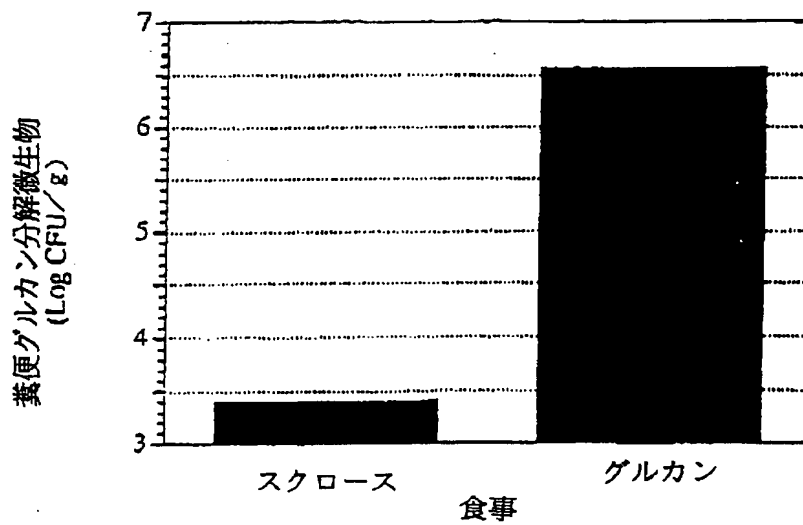


Fig. 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/AU 97/00859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int Cl ⁶ : A61K 031/715		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 031/715		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DERWENT DATABASE, glucan, yeast, saccharomy cerevisiae, bowel, diarrhoea, STN INTERNATIONAL KEYWORDS: constipation, colon, sleep, arthritis, chronic fatigue syndrome, colitis, gastrointestinal, enteric, flora, microflora, gut, intestine, lactobacteria		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Patent Abstracts of Japan JP 08157377 A (NIPPON OIL CO LTD) 18 June 1996 - abstract	1-16
X	US 5576015 A (B A DONZIS) 19 November 1996 see whole document	1-16
P,X	AU 61824/96 A (CARLTON AND UNITED BREWERIES LIMITED) 23 January 1997 see whole document	1-16
X	WO 96/26732 A (NEUPHARMA Srl) 6 September 1996 see whole document	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* "A" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 January 1998		Date of mailing of the international search report 10 MAR 1998
Name and mailing address of the ISA/AU IP AUSTRALIA PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile No.: (02) 6285 3929		Authorized officer BERNARD NUTT Telephone No.: (02) 6283 2491

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/AU 97/00859

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90/04334 A (ALPHA BETA TECHNOLOGY) 3 May 1990 see whole document	1-16
P,X	Front Foods Food Ingredients (1997), 2 (New Technologies for Healthy Foods & Nutraceuticals), pages 53-70. Manssur Yalpani, "Nutraceuticals - A Materials-Based Perspective" see in particular pages 63-65	1-16

International Application No.
PCT/AU 97/00859

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
AU	61824/96	WO	97/0123				
WO	90/04334	CA	900428	AU	44924/89	DE	940707
		EP	910814	JP	921022	NZ	970526
		US	901009	ZA	911030		

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

- (71)出願人 アーノッツ、ビスキッツ、リミテッド
オーストラリア連邦ニューサウスウェイルズ州、ホームブッシュ、ジョージ、ストリート、11
- (71)出願人 バーンズ、フィルプ、エンド、カンパニー、リミテッド
オーストラリア連邦ニューサウスウェイルズ州、シドニー、ブリッジ、ストリート、7
- (71)出願人 バーンズ、フィルプ、リサーチ、エンド、ディベロップメント、プロプライエタリ、リミテッド
オーストラリア連邦ニューサウスウェイルズ州、ノース、ライド、エッピング、ロード、67
- (71)出願人 グッドマン、フィールダー、イングレディエンツ、リミテッド
オーストラリア連邦ニューサウスウェイルズ州、グレイズビル、ビクトリア、ロード、230、レベル、4
- (71)出願人 ギストーブロウケイズ、オーストラリア、プロプライエタリ、リミテッド
オーストラリア連邦ニューサウスウェイルズ州、ムアバンク、ムアバンク、アベニュー、9
- (72)発明者 パトリシア、リン、コンウェイ
オーストラリア連邦ニューサウスウェイルズ州、ラ、ペローズ、グーラワール、アベニュー、22

- (72)発明者 ロス、クリッテンデン
オーストラリア連邦ビクトリア州、チェルトナン、アクセルトン、ストリート、2
ノ8
- (72)発明者 アンダース、ヘンリクソン
オーストラリア連邦ニューサウスウェールズ州、コーギー、キャリントン、ロード、5ノ128
- (72)発明者 レイチェル、ジェーン、ルーカス
オーストラリア連邦ニューサウスウェールズ州、ダルウィッチ、ヒル、ウィンザー、ロード、6
- (72)発明者 シン、ワン
オーストラリア連邦ニューサウスウェールズ州、ランドウィック、ボタニー、ストリート、8エイノ31